



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 088**

51 Int. Cl.:
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03798087 .7**
86 Fecha de presentación : **24.09.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1546202**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Polipéptidos del Factor VII de la coagulación humana.**

30 Prioridad: **25.09.2002 DK 2002 01423**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Persson, Egon y**
Olsen, Ole, Hvilsted

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del factor VII de la coagulación humana.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos del Factor VIIa de la coagulación humana con actividad coagulante así como a constructos de polinucleótido que codifican tales polipéptidos, vectores y células huéspedes que comprenden y expresan el polinucleótido, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes (o factores) sanguíneos que finalmente dan lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha denominado como la “cascada” de coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que él mismo es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que han sufrido tal conversión son generalmente denominados “factores activos”, y están designados por la adición de la letra “a” al nombre del factor de coagulación (p. ej. Factor VIIa).

La iniciación del proceso hemostático está mediada por la formación de un complejo entre el factor tisular, expuesto como resultado de una lesión en la pared del vaso, y el Factor VIIa. Este complejo convierte después los factores IX y X en sus formas activas. El Factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina en trombina en la célula que alberga el factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los Factores V y VIII en los Factores Va y VIIIa, ambos cofactores en el proceso adicional conduciendo a la explosión completa de la trombina. Este proceso incluye la generación del Factor Xa por el Factor IXa (en un complejo con el Factor VIIIa) y ocurre en la superficie de las plaquetas activadas. La trombina finalmente convierte el fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina. En los últimos años el Factor VII y el factor tisular han sido encontrados como los iniciadores principales de la coagulación sanguínea.

El Factor VII es una glicoproteína plasmática de un elemento traza el cual circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. El factor VII monocatenario puede ser convertido en factor VIIa bicatenario por el Factor Xa, Factor XIIa, Factor IXa, Factor VIIa o trombina *in vitro*. Se cree que el Factor Xa es el activador fisiológico más importante del factor VII. Como otras muchas proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasis, el factor VII depende de la vitamina K por su actividad, que está requerida para la gamma-carboxilación de múltiples residuos de ácido glutámico que están reagrupados cerca del terminal amino de la proteína. Estos ácidos glutámicos gamma-carboxilados son requeridos para la interacción inducida por iones metálicos del factor VII con fosfolípidos. La conversión del factor VII zimógeno en la molécula bicatenaria activada ocurre por el seccionamiento de un enlace peptídico interno Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. En presencia del factor tisular, los fosfolípidos y los iones de calcio, el factor VIIa bicatenario activa rápidamente al factor X o factor IX por proteólisis limitada.

Con frecuencia, es deseable el hecho de estimular o mejorar la cascada de coagulación en un sujeto. Se ha usado el Factor VIIa para controlar los trastornos hemorrágicos que tienen causas diferentes tales como deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de la coagulación) o de inhibidores del factor de coagulación. El Factor VIIa también ha sido usado para controlar un desangramiento excesivo que se produce en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea de funcionamiento normal (ninguna deficiencia del factor de coagulación o inhibidores contra ninguno de los factores de coagulación). Esta hemorragia puede, por ejemplo, ser provocada por una función defectuosa de las plaquetas, por trombocitopenia o por la enfermedad de von Willebrand. La hemorragia es también un problema importante con respecto a la cirugía y otras formas de lesiones tisulares.

La Patente Europea n°. 200.421 (ZymoGenetics) se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el factor VII humano y a la expresión recombinante del factor VII en células mamíferas.

Dickinson *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 14379-14384) se refiere a una variante del Factor VII donde Leu305 ha sido sustituida por Ala (FVII(Ala305)).

Iwanaga *et al.* (Thromb. Haemost. (suplemento de Agosto 1999); 466; resumen 1474) se refiere a las variantes del factor VIIa donde los residuos 316-320 son deleccionados o los residuos 311-322 son sustituidos por los residuos de tripsina correspondientes.

Las solicitudes de patentes internacionales WO 01/83725 y WO 02/22776 se refieren a variantes del Factor VIIa con actividad aumentada.

Hay una necesidad de variantes del Factor VIIa con actividad coagulante, variantes con una actividad elevada que pueden ser administradas en dosis relativamente bajas, y de variantes que no producen los efectos secundarios indeseables tales como la activación sistémica del sistema de coagulación y hemorrágico, respectivamente, asociados con las terapias convencionales.

Descripción de la invención

La presente invención ha sido limitada a un polipéptido del Factor VII que comprende sustituciones en F379 y R337 de la SEC ID NO 1. Todas las demás variantes que no comprenden al menos estas dos mutaciones son meros ejemplos adicionales y no definen la invención.

Se ha encontrado ahora que las variantes del polipéptido del Factor VIIa de la coagulación humana en las que el aminoácido Phe374 y al menos un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en Lys157, Leu305, Ser314, Lys337, Asp334, Ser336, Val158, Glu296, y Met298 de la SEC ID NO:1 son sustituidos por diferentes aminoácidos tienen una actividad coagulante aumentada en comparación con el Factor VIIa de la coagulación humana de tipo salvaje.

El término “un aminoácido diferente” como se utiliza en este caso significa un aminoácido que es diferente del aminoácido naturalmente presente en esta posición. Éste incluye pero no se limita a los aminoácidos que pueden ser codificados por un polinucleótido. En una forma de realización, el aminoácido diferente tiene una configuración en L natural y puede ser codificado por un polinucleótido. Un ejemplo específico es la L-cisteína (Cys).

El término “actividad” como se utiliza en este caso significa la capacidad de un polipéptido del Factor VII para convertir su factor X del sustrato al Factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del Factor VII puede ser medida con el “Ensayo de proteólisis *in vitro*” (ver ejemplo 4).

El término “actividad inherente” también incluye la capacidad para generar trombina en la superficie de las plaquetas activadas en la ausencia del factor tisular.

El residuo Phe374 está localizado en el extremo de una α -hélice que comienza en el residuo 307. Esta α -hélice se encuentra en la forma compleja del factor tisular del Factor VIIa. En el Factor VIIa libre (Factor VIIa no unido al factor tisular) la hélice está distorsionada y por lo tanto es posiblemente inestable. Se cree que la hélice es importante para la actividad. Las variantes según la presente invención pueden lograr la conformación activa, que normalmente tiene que ser inducida por el factor tisular.

La actividad aumentada puede deberse a una estabilización de la α -hélice comenzando en el residuo 307, una reorientación de la hélice o algún otro cambio en su conformación. La sustitución del residuo Phe374, que está localizado en la extremidad de la hélice, inducirá una reorientación y/o estabilización de la hélice.

Debido a la actividad inherente más alta de la variante del Factor VIIa descrita en comparación con el Factor VIIa nativo, una dosis inferior será adecuada para obtener una concentración funcionalmente adecuada en el sitio de acción y así será posible administrar una dosis inferior al sujeto que tiene episodios hemorrágicos o que precisa una mejora del sistema hemostático normal.

Leu305 está localizado en el otro extremo de esta α -hélice encontrada en la forma compleja del factor tisular del Factor VIIa, considerándose importante para la actividad. La sustitución de Leu305 puede también inducir una reorientación y/o estabilización de la hélice.

Los aminoácidos que comprenden Lys157, Ser314, Lys337, Asp334, Ser336, Val158, Glu296, y Met298 están localizados en un área que se considera que afecta a la inserción del término amino del dominio de proteasa y de ese modo a la formación de la configuración catalíticamente activa del Factor VIIa que depende de un puente de sal entre el grupo amino terminal de Ile153 y la cadena lateral de Asp343. Las sustituciones pueden eliminar repulsiones electrostáticas, añadir enlaces de hidrógeno o por el contrario facilitar la inserción del término amino.

Debido a la actividad inherente más alta de las variantes del polipéptido del factor VIIa descritas en comparación con el FVIIa nativo, una dosis inferior puede ser adecuada para obtener una concentración funcionalmente adecuada en el sitio de acción y así será posible administrar una dosis inferior al sujeto que tiene episodios hemorrágicos o que precisa una mejora del sistema hemostático normal.

Los presentes inventores han descubierto que mediante la sustitución del aminoácido Phe374 en combinación con uno o varios Lys en la posición 157 y Lys en la posición 337 y Val en la posición 158 y Glu en la posición 296 y Met en posición 298 y Asp en la posición 334 y Ser en la posición 336 y Leu en la posición 305 y Ser en la posición 314, el Factor VIIa espontáneamente logrará una configuración más activa que la que tiene que ser inducida normalmente por el factor tisular. Tales variantes del polipéptido del Factor VIIa muestran una actividad inherente que puede ser terapéuticamente útil en situaciones en las que la actividad procoagulante es independiente del factor tisular (generación del Factor Xa en la superficie de las plaquetas) así como cuando se administran grandes dosis de, por ejemplo, NovoSeven®.

En otra forma de realización adicional, la sustitución de aminoácidos en el dominio proteasa facilita además la formación de la configuración activa de la molécula. Se cree, no obstante, que los efectos más pronunciados se verán cuando las mutaciones mencionadas arriba se realizan en la proximidad (secuencia) o tridimensional) de estos siete últimos aminoácidos.

La invención además comprende la sustitución de algunos aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (los aminoácidos en la posición correspondiente a 1-37 de la SEC ID NO:1) del Factor VIIa puede proporcionar la proteína con una afinidad sustancialmente más alta a los fosfolípidos de la membrana, tales como los fosfolípidos de la membrana de células que soportan el factor tisular o de las plaquetas, de ese modo generando variantes del polipéptido del Factor VII con un efecto procoagulante mejorado.

De esta manera, las variantes del polipéptido del Factor VIIa mencionadas arriba, además de la sustitución del aminoácido ya realizada en la posición F374 en combinación con las sustituciones en las posiciones L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298 y las sustituciones de los aminoácidos opcionales en otro lugar en el dominio de la proteasa, también tienen al menos un aminoácido sustituido en el dominio Gla N-terminal, de ese modo obteniendo una proteína con una actividad aumentada al igual que una afinidad aumentada a los fosfolípidos de la membrana en comparación con el factor VII nativo. Preferiblemente los aminoácidos en las posiciones 10 y 32 (en referencia a la SEC ID NO:1) del factor VII pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente. Ejemplos de aminoácidos preferidos para ser incorporados en las posiciones mencionadas arriba son: el aminoácido Pro en la posición 10 se sustituye por Gln, Arg, su, Gln, Asn o Lys; y/o el aminoácido Lys en la posición 32 se sustituye por Glu, Gln o Asn.

Otros aminoácidos en el dominio Gla, en base a las diferentes afinidades de fosfolípidos y secuencias de las proteínas plasmáticas dependientes de la vitamina K, pueden también ser considerados para la sustitución.

El término “dominio GLA N-terminal” significa la secuencia de aminoácidos 1-37 del Factor VII.

La indicación de tres letras “GLA” significa (7-carboxiglutamato) de ácido 4-carboxiglutámico.

El término “dominio de proteasa” significa la secuencia de aminoácidos 153-406 del Factor VII (la cadena pesada del Factor VIIa).

El término “polipéptido de Factor VII” como se utiliza en este caso significa cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1- 406 del Factor VII nativo humano (SEC ID NO: 1) o variantes del mismo. Éste incluye pero no se limita al Factor VII humano, el Factor VII humano y variantes del mismo.

El término “Factor VII” como se utiliza en este caso se destina a comprender la molécula monocatenaria inactiva del Factor VII zimógeno al igual que la molécula bicatenaria activada del Factor VII (Factor VIIa). Éste incluye las proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 del Factor VII nativo humano o Factor VIIa. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado que incluye delecciones del aminoácido N-terminal o adiciones al mismo tiempo que estas proteínas retienen sustancialmente la actividad del Factor VIIa. El término “Factor VIIa”, o “FVIIa” como se utiliza en este caso significa un producto que consiste en la forma activada (Factor VIIa). “Factor VII” o “Factor VIIa” dentro de la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y producirse de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones de post-traducción pueden variar dependiendo de las células huéspedes elegidas y de la naturaleza del entorno del huésped celular.

Los términos “variante” o “variantes”, como se utilizan en este caso, se destinan a designar el Factor VII que tiene la secuencia de la SEC ID NO:1, donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora ha(n) sido sustituido(s) por otro aminoácido y/o donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora ha sido delecionado y/o donde uno o más aminoácidos ha sido insertado en la proteína y/o donde uno o más aminoácidos ha sido añadido a la proteína progenitora. Tal adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína progenitora o en ambos. La “variante” o “variantes” dentro de esta definición además tienen actividad FVII en su forma activada. En una forma de realización, una variante es idéntica en un 70% a la secuencia de la SEC ID NO:1. En una forma de realización una variante es idéntica en un 80% a la secuencia de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es idéntica en un 90% a la secuencia de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización, una variante es idéntica en un 95% a la secuencia de la SEC ID NO:1. En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII que comprende al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con tres sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con cuatro sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de tres aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de factor VII con cinco sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de cuatro aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con seis sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de cinco aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con siete sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de seis aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con ocho sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de siete aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con nueve sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de ocho aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII con diez sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de los aminoácidos L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

En otro aspecto, la invención se refiere a un constructo de polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298.

El término “constructo” apunta a indicar un segmento del polinucleótido que puede estar basado en una secuencia de nucleótidos completa o parcial de origen natural que codifica el polipéptido de interés. El constructo puede opcionalmente contener otros segmentos del polinucleótido. En una vía similar, el término “aminoácidos que pueden ser codificados por constructos del polinucleótido” comprende los aminoácidos que pueden ser codificados por los constructos del polinucleótido definidos arriba, es decir los aminoácidos tales como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector recombinante que comprende el constructo del polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII.

El término “vector”, como se utiliza en este caso, significa cualquier entidad de ácidos nucleicos capaz de realizar la amplificación en una célula huésped. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al introducirse en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el que ha sido integrado. La elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que deba ser introducido. Los vectores incluyen, pero no se limitan a vectores plásmidos, vectores fágicos, vectores de virus o cósmidos. Los vectores normalmente contienen un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o cuya presencia es esencial para el crecimiento celular.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende el constructo del polinucleótido o el vector. En una forma de realización, la célula huésped recombinante es una célula eucariótica. En otra forma de realización, la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En otra forma de realización la célula huésped recombinante está seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.

El término “una célula huésped”, como se utiliza en este caso, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, en las que se puede expresar el ADN heterólogo. Las células huéspedes típicas incluyen, pero no se limitan

a células de insecto, células de levadura, células mamíferas, incluidas las células humanas, tales como las células BHK, CHC), HEK, y COS. Al poner en práctica la presente invención, las células huéspedes que son cultivadas son preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente una línea celular establecida de mamífero, incluyendo, sin limitación, las líneas celulares CHO (p. ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), de riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293 (p. ej., ATCC CRL 1573; Graham *et Al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk- ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), de aquí en adelante denominadas células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible por la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852; bajo el número de acceso CRL 10314 de la ATCC. Una línea celular tk- ts13 BHK está también disponible por la ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, células Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980). También son útiles las células 3T3, las células de Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.

En otro aspecto, la invención proporciona un animal transgénico que contiene y expresa el constructo del polinucleótido.

En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que contiene y expresa el constructo del polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del Factor VII de la invención, el método comprendiendo el cultivo de una célula que comprende el constructo de polinucleótido en un medio de crecimiento apropiado bajo las condiciones que permiten la expresión del constructo de polinucleótido y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

Como se utiliza en este caso el término “medio de crecimiento apropiado” significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del Factor VII de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del Factor VII, el método comprendiendo la recuperación del polipéptido de leche producido por el animal transgénico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del Factor VII, el método comprendiendo el cultivo de una célula de una planta transgénica que comprende el constructo de polinucleótido, y la recuperación del polipéptido de la resultante planta.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298; para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hemorrágicos o episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal. En una forma de realización se utiliza para el tratamiento de la hemofilia A o B.

En este contexto, el término “tratamiento” se entiende que incluye tanto la prevención de una hemorragia prevista, como en cirugía, como la regulación de una hemorragia ya producida, como en un trauma, con el propósito de inhibir o minimizar la hemorragia. La administración profiláctica del polipéptido del Factor VIIa según la invención está por tanto incluida en el término “tratamiento”.

El término “episodios hemorrágicos” se entiende que incluye una hemorragia descontrolada y excesiva. Los episodios hemorrágicos pueden ser un problema más importante tanto en relación con la cirugía como otras formas de daños en el tejido. Una hemorragia descontrolada y excesiva puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y sujetos con trastornos de coagulación o hemorrágicos. Como se utiliza en este caso el término “trastorno hemorrágico” refleja cualquier defecto, congénito, adquirido o inducido, de origen celular o molecular que se manifiesta en las hemorragias. Ejemplos son deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII), inhibidores del factor de coagulación, función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

Las hemorragias excesivas también ocurren en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea con funcionamiento normal (sin deficiencias del factor de coagulación o -inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden ser provocados por una función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En estos casos, las hemorragias se pueden comparar con las hemorragias provocadas por la hemofilia porque el sistema hemostático, como ocurre en la hemofilia, carece de o tiene “compuestos” esenciales de coagula-

ción anormales (tales como las plaquetas o proteína del factor de von Willebrand) que causa hemorragias mayores. En sujetos que experimentan un daño extenso en el tejido asociado con la cirugía o un trauma grande, el mecanismo hemostático normal puede ser saturado por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar una hemorragia a pesar de un mecanismo hemostático normal. La realización de una hemostasis satisfactoria también es un problema cuando ocurren hemorragias en órganos tales como el cerebro, en la región interna de la oreja y en los ojos con limitada posibilidad de hemostasis quirúrgica. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en cirugía laparoscópica. Es común en estas situaciones la dificultad de proporcionar hemostasis por técnicas quirúrgicas, (sutura, clips, etc.) siendo también el caso cuando la hemorragia está difusa (gastritis hemorrágica y hemorragia uterina profusa). Las hemorragias agudas y profusas pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante en quienes una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Estos sujetos pueden precisar intervenciones quirúrgicas en el caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. La prostatectomía retropúbica radical es un procedimiento realizado de forma común en sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación se ve frecuentemente complicada por una pérdida de sangre significativa y a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante la prostatectomía está principalmente relacionada con una situación anatómica complicada, con varios sitios densamente vascularizados que no son fácilmente accesibles para la hemostasis quirúrgica, y que pueden resultar en una hemorragia difusa de un área grande. Otra situación que puede causar problemas en el caso de una hemostasis insatisfactoria es cuando a sujetos con un mecanismo hemostático normal se les da una terapia anticoagulante para prevenir una enfermedad tromboembólica. Esta terapia puede incluir la heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K al igual que la aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

En una forma de realización de la invención, la hemorragia está asociada con la hemofilia. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la trombocitopenia. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con el daño tisular severo. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con un trauma severo. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la cirugía. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, la hemorragia es una hemorragia uterina profusa. En otra forma de realización, la hemorragia se produce en órganos con una limitada posibilidad de hemostasis mecánica. En otra forma de realización, la hemorragia se produce en el cerebro, en la región interna de la oreja o en los ojos. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con el proceso de la toma de biopsias. En otra forma de realización, la hemorragia está asociada con la terapia anticoagulante.

El término “sujeto” como se utiliza en este caso apunta a significar cualquier animal, en particular mamíferos, tales como los seres humanos, y, si fuera apropiado, puede ser usado de forma intercambiable con el término “paciente”.

El término “mejora del sistema hemostático normal” significa una mejora de la capacidad para generar trombina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de trastornos hemorrágicos o de episodios hemorrágicos en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal, el método comprendiendo la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) sustitución por cualquier otro aminoácido de un aminoácido o más seleccionado(s) del grupo que consiste en L305, S314, K157, K337, D334, S336, V158, E296, y M298; en un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la invención se refiere al polipéptido del Factor VII de la invención para el uso como un medicamento.

En una forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y L305 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y S314 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y K157 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y K337 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y D334 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y S336 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y V158 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y E296 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde F374 es sustituido por cualquier otro aminoácido y M298 es sustituido por cualquier otro aminoácido.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de la proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido. En una forma de realización, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de la proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde como mucho 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de la proteasa han sido sustituidos por otros aminoácidos cualquiera.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de la SEC ID NO: ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde R304 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido. En una forma de realización R304 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Phe, Leu, y Met.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 306-312 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde M306 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, y Asn.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde D309 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, y Thr.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde A274 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde A274 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Met, Leu, Lys, y Arg.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde K157 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Arg, His, Asp y Gln.

55 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde K157 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Arg, His, Asp y Gln.

65 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho D334 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, y Gln.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho D334 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho S336 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho S336 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho V158 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho V158 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho E296 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho E296 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, y Val.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho M298 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho M298 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Tyr y Ile.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido sustituido por Val.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho S314 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho S314 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Lys, Gln y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho F374 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho F374 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Tyr.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido ha sido sustituido por un aminoácido diferente que puede ser codificado por los constructos de polinucleótido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del Factor VII es el Factor VII humano.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del Factor VII es el Factor VII humano.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido de Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25. En una forma de realización la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 2,0. En otra forma de realización la proporción entre la actividad de dicho polipéptido

tido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 4,0.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25 al evaluarse en un ensayo de actividad del Factor VIIa. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 2,0 al evaluarse en un ensayo de actividad del Factor VIIa. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 4,0 evaluado en un ensayo de actividad del factor VIIa. La actividad del factor VIIa puede ser medida por los ensayos descritos en los ejemplos 3 o 4.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25 evaluado en el “Ensayo de hidrólisis *in vitro*”. En una forma de realización la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 2,0 evaluado en el “Ensayo de hidrólisis *in vitro*”. En otra forma de realización la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 4,0 evaluado en el “Ensayo de hidrólisis *in vitro*”.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25 evaluado en el “Ensayo de proteólisis *in vitro*”. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 2,0 evaluado en el “Ensayo de proteólisis *in vitro*”. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NC:1 es al menos aproximadamente 4,0 evaluado en el “Ensayo de proteólisis *in vitro*”. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 8,0 evaluado en el “Ensayo de proteólisis *in vitro*”.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) F374Y y (ii) uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en K157X¹, K337A, D334X², S336X³, V158X⁴, E296V, M298Q, L305V, S314E, donde X¹ es Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, o Glu; X² es Gly o Glu; X³ es Gly o Glu; X⁴ es Thr o Asp.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/V158D-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/V158T-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/M298Q-FVII.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337AN158D-FVII.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/E296V-FVII.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/S314E-FVII

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/M298Q-FVII.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/E296V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/S314E/M298Q-FVII.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/E296V/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337AN1580-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/M298Q-FVII.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296VN158T-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/M298QN158T-FVII.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN 158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/S314EN158T-FVII.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII

55 en otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/S314EN158D-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337AN158T/E296V-FVII.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/M298QNI58D-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/K337A/E296VN158D-FVII.

65 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN 158D/S314E/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/S314E/E296V-FVII.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/M298Q/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/S314E/E296V-FVII.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/S314E/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/M298Q/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es P374YN158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/E296V/M298Q/S314E-FVII.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/K337A/S314E-FVII.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/M298Q/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/E296V/K337A/S314E-FVII.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/M298Q/K337A-FVII.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/M298Q/S314E-FVII.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/S314E-FVII.

55 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/E296V/M298Q/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/E296V/M298Q/S314E-FVII.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/M298Q/K337A/S314E-FVII.

65 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158T/E296V/K337A/S314E-FVII.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/E296V/M298Q-FVII.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/M298Q/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/E296V/K337A-FVII.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/M298Q/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158T/E296V/S314E-FVII.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374YN158D/E296V/M298QIK337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q/S314E-FVII.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337AN158T-FVII.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/M298Q/K337AA/158T/S314E-FVII.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/M298Q/K337A/S314E-FVII.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337AA/158T/S314E-FVII

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) dos sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

55 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) tres sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) cuatro sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) sustituciones de cinco aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

65 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) seis sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según tabla 1.

ES 2 293 088 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) siete sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) sustituciones de ocho aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es FVII humano con (i) la sustitución del aminoácido F374Y relativo a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y (ii) sustituciones de nueve aminoácidos independientemente seleccionados de cualquier combinación según la tabla 1.

Sustitución de aminoácidos relativa a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 1. (+: combinación válida, n: no aplicable)	L305V	S314E	K337A	V158D	V158T	E296V	M298Q	S336E	S336G	D334E	D334G	K157E	K157D	K157Q	K157N	K157T	K157S	K157V	K157G
L305V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S314E	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K337A	+	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V158D	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V158T	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E296V	+	+	+	+	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M298Q	+	+	+	+	+	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S336E	+	+	+	+	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S336G	+	+	+	+	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D334E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+
D334G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+
K157E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157Q	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n
K157G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n

En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos del Factor VIIa de la coagulación humana que han aumentado la actividad independiente del factor tisular en comparación con el Factor VIIa nativo de la coagulación humana. En otro aspecto, la actividad aumentada no está acompañada por cambios en la especificidad del sustrato. En otro aspecto de la invención, la unión de las variantes del polipéptido al factor tisular no debería verse perjudicada y las variantes de los polipéptidos deberían tener al menos la actividad del Factor VIIa tipo salvaje al unirse al factor tisular.

La terminología para sustituciones de aminoácidos utilizada en esta descripción es la siguiente. La primera letra representa el aminoácido presente de forma natural en una posición de la SEC ID NO:1. El número siguiente representa la posición en la SEC ID NO: 1. La segunda letra representa la sustitución del aminoácido diferente por el aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/K337A-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID NO:1 es sustituida por una valina y la lisina en la posición 337 de la SEC ID NO:1 es sustituida por una alanina, ambas mutaciones en la misma variante del polipéptido del Factor VII.

En este contexto las indicaciones de tres letras o de una sola letra de los aminoácidos han sido usadas en su significado convencional como se indica en la tabla 2. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos. Además, las extremidades izquierda y derecha de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los términos N y C a menos que se indique lo contrario.

TABLA 2

Abreviaturas para aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una sola letra
Glicina	Gly	G
Prolina	Pro	P
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Glutamina	Gln	Q
Asparagina	Asn	N
Ácido glutámico	Glu	E
Ácido aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

Preparación de variantes del polipéptido del Factor VII

La invención también se refiere a un método de preparación de variantes del polipéptido del Factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Las variantes del polipéptido del Factor VII descritas aquí pueden ser producidas mediante técnicas de ácidos nucleicos recombinantes. En general, una secuencia de ácidos nucleicos clonada del Factor VII tipo salvaje es modificada para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada es luego insertada en un vector de expresión, que es sucesivamente transformado o modificado en células huéspedes. Se prefieren como células huéspedes las células eucarióticas superiores, en particular las células mamíferas cultivadas. Las secuencias completas de nucleótidos y de aminoácidos para el Factor VII humano son conocidas (ver U.S. 4.784.950, donde se describe la clonación y expresión del factor VII recombinante humano). La secuencia del Factor VII bovino se describe en Takeya *et Al.*, J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988)).

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden ser realizadas por una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ácidos nucleicos puede realizarse por mutagénesis sitio específica. Las técnicas para la mutagénesis sitio específica son bien conocidas en la técnica y están descritas en, por ejemplo, Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extension overlap", Horton *et Al.*, Gene 77, 1989; págs. 61-68. De este modo, usando el nucleótido y las secuencias de aminoácidos del Factor VII, se puede(n) introducir la(s) alteración(s) de elección. Asimismo, los procedimientos para preparar un constructo de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos son conocidos por los expertos en la técnica (ver PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EEUU).

El constructo de ácidos nucleicos que codifica la variante del polipéptido del Factor VII de la invención puede de manera adecuada ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo se puede obtener preparando una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando para la codificación de secuencias de ADN a todo o parte del polipéptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándares (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; 1989).

El constructo de ácidos nucleicos que codifica la variante del polipéptido del Factor VII puede también ser preparado sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. ej. el método de la fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Mattes *et Al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. Según el método de la fosfoamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, purificados, recocidos, ligados y donados en los vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del Factor VII humano pueden también ser preparadas por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4.683.202, Saiki *et Al.*, Science 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook *et al.*, *supra*.

Además, el constructo de ácidos nucleicos puede ser de origen sintético y genómico mezclado, sintético y de ADNc mezclado o genómico y de ADNc mezclado preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado), los fragmentos correspondiendo a varias partes del constructo de ácidos nucleicos entero, conforme a las técnicas estándares.

El constructo de ácidos nucleicos es preferiblemente un constructo de ADN. Las secuencias de ADN para el uso para producir variantes del polipéptido del Factor VII según la presente invención normalmente codifican un polipéptido prepro en el término amino del Factor VII para obtener un tratamiento postraducciona apropiado (p. ej. la gamma-carboxilación de los residuos del ácido glutámico) y la secreción de la célula huésped. El polipéptido prepro puede ser aquel del Factor VII u otra proteína plasmática dependiente de la vitamina K, tal como el Factor IX, Factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como será apreciado por los expertos en la técnica, se pueden hacer modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos de las variantes del polipéptido del Factor VII donde estas modificaciones no perjudican significativamente a la capacidad de la proteína para actuar como un coagulante. Por ejemplo, las variantes del polipéptido del Factor VII pueden también ser modificadas en el sitio de seccionamiento de la activación para inhibir la conversión del Factor VII del zimógeno en su forma bicatenaria activada, como está generalmente descrito en U.S. 5.288,629, incorporada aquí por referencia.

Las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del Factor VII humano son normalmente insertadas en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que puede ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducirlo. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser uno que al introducirse en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado.

El vector es preferiblemente un vector de expresión donde la secuencia de ADN que codifica las variantes del polipéptido del Factor VII humano está operativamente enlazado a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión está derivado del plásmido o ADN vírico, o puede contener elementos de ambos. El término, "enlazado operativamente" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para los fines a los que están destinados, p. ej. la transcripción se inicia en un promotor y continua a través de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido.

Los vectores de expresión que se utilizarán para expresar las variantes del polipéptido del Factor VIIa comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o de ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de genes que codifican proteínas bien homólogas o bien heterólogas a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante del polipéptido del Factor VII humano en células mamíferas son el promotor SV40 (Subramani *et al.*, Mol. Cell Biol. 1 (1981); 854-864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter *et al.*, Science 222 (1983); 809 - 814), el promotor CMV (Boshart *et al.*, Cell 41:521-530, 1985) o el promotor tardío mayor del adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, Mol. Cell. Biol; 2:1304-1319, 1982).

Un ejemplo de un promotor adecuado para el uso en células de insecto es el promotor de polihedrina (US 4.745.051; Vasuvedan *et al.*, FEBS. Lett. 311; (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlak *et al.*, J. Gen. Virology 69, 1988; págs. 765-776), el promotor de la proteína básica del virus de la polihedrosis de *Autographa californica* (EP 397 485), el promotor del gen 1 inmediato temprano baculovirus (US 5.155.037; US 5.162.222), o el promotor del gen 39K retardado temprano del baculovirus (US 5.155.037; US 5.162.222).

Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huéspedes de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255 (1980); 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982); 419 - 434) o genes de alcohol-deshidrogenasa (Young *et al.*, en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals* (Hollaender *et al.*, eds) Plenum Press, New York, 1982), o los promotores de TPI1 (US 4.599.311) o de ADH2-4c (Russell *et al.*, Nature 304 (1983); 652 - 654).

Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huéspedes de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4 (1985); 2093 - 2099) o el promotor de tpiA. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa de *A. niger*, la α -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger* o de *A. awamori* (gluA), la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*. Se prefieren los promotores de la TAKA amilasa y de gluA. Promotores adecuados están mencionados en, p. ej. EP 238 023 y EP 383 779.

Las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del factor VII humano pueden también, si fuera necesario, estar operativamente conectadas a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona del crecimiento humana (Palmiter *et al.*, Science 222, 1983; págs. 809-814) o los terminadores de TPI1 (Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982; págs. 419-434) o de ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4, 1985; págs. 2093-2099). Los vectores de expresión pueden también contener un grupo de sitios de empalme de ARN localizados en sentido descendente del promotor y en sentido ascendente del sitio de inserción para la propia secuencia del Factor VII. Los sitios de empalme de ARN preferidos pueden ser obtenidos de adenovirus y/o de genes de inmunoglobulina. También en los vectores de expresión se encuentra contenida una señal de poliadenilación localizada debajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal temprana o tardía de poliadenilación de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región Elb del adenovirus 5, el terminador del gen de la hormona del crecimiento humano (DeNoto *et al.* Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen del Factor VII humano o del gen del Factor VII bovino. Los vectores de expresión pueden también incluir una secuencia líder vírica no codificante, tal como la secuencia líder tripartita del adenovirus 2, localizada entre el promotor y los sitios de empalme del ARN; y secuencias de potenciadores, tales como el potenciador de SV40.

Para dirigir las variantes del polipéptido del Factor VII humano de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) puede ser proporcionada en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del Factor VII humano en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se sitúan de forma común en 5' en la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser aquella que, normalmente está asociada con la proteína o puede provenir de un gen que codifica a otra proteína segregada.

Para la secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, lo que asegura una dirección eficaz de las variantes del polipéptido del Factor VII humano expresado en la vía secretora de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético. Se ha encontrado que los péptidos señal adecuados son el péptido señal del α -factor (ver. US 4.870.008), el péptido señal de la amilasa salival de ratón (ver. O. Hagenbuehle *et al.*, Nature 289, 1981; págs. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (ver. L.A. Valls *et al.*, Cell 48, 1987; págs. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (ver. WO 87/02670), o el péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (ver. M. Egel-Mitani *et al.*, Yeast 6, 1990; págs. 127-137).

Para una secreción eficaz en levadura, una secuencia que codifica un péptido líder puede también ser insertada en sentido descendente de la secuencia señal y en sentido ascendente de la secuencia de ADN que codifica las variantes del polipéptido del Factor VII humano. La función del péptido líder es permitir al péptido expresado que sea dirigido del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y después a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir exportación de las variantes del polipéptido del Factor VII humano a través de la pared celular o al

menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder del alfa-factor de levadura (cuyo uso está descrito en p. ej. US 4.546.082, US 4.870.008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). De forma alternativa, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir un péptido líder no encontrado en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, ser contruidos como se describe en WO 89/02463 o WO 92/11378.

Para el uso en hongos filamentosos, el péptido señal puede convenientemente derivar de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de *Aspergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal está preferiblemente derivado de un gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la α -amilasa de *A. niger*, la amilasa estable en ácido de *A. niger*, o la glucoamilasa de *A. niger*. Los péptidos señal adecuados están descritos en, p. ej. EP 238 023 y EP 215 594.

Para el uso en células de insecto, el péptido señal puede convenientemente derivar de un gen de insecto (ver. WO 90/05783), tal como el péptido señal precursor de la hormona adipocinética de la *Manduca sexta* (ver. US 5.023.328).

Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para las variantes del polipéptido del Factor VII humano, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en los vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et Al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Los métodos de transfección de células mamíferas y de expresión de secuencias de ADN introducidas en las células están descritos en p. ej. Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982); 327 - 341; Loyer *et Al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79 (1982); 422 - 426; Wigler *et Al.*, Cell 14 (1978); 725; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981); 603, Graham y van der Eb, Virology 52 (1973), 456; y Neumann *et al.*, EMBO J. 1 (1982), 841 - 845.

Las secuencias de ADN clonadas son introducidas en células mamíferas cultivadas, por ejemplo, por transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et Al.*, Cell 14:725-732, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) o por electroporación (Neumann *et Al.*, EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar las células que expresan el ADN exógeno, se introduce generalmente un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) en las células junto con el gen o el ADN de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen genes que confieren resistencia a los fármacos tales como la neomicina, la higromicina, y el metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia de dihidrofolato-reductasa (DH-FR). Los marcadores seleccionables están revisados por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporado aquí por referencia). Un experto en la materia podrá elegir fácilmente los marcadores seleccionables adecuados.

Los marcadores seleccionables pueden ser introducidos en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden ser introducidos en el mismo plásmido. Si, en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o del mismo promotor, ésta disposición produce un mensaje bicistónico. Los constructos de este tipo son conocidos en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, U.S. 4.713.339). Puede también ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador" a la mezcla que se introduce en las células.

Después de que las células han utilizado el ADN, éstas crecen en un medio de crecimiento apropiado, normalmente 1 a 2 días, para iniciar la expresión del gen de interés. Como se utiliza en este caso el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de las variantes del polipéptido del Factor VII humano de interés. Los medios generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteína y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma-carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1 μ g/ml a aproximadamente 5 μ g/ml. La selección de medicamentos es luego aplicada para seleccionar el crecimiento de las células que están expresando el marcador seleccionable en una forma estable. Para las células que han sido modificadas con un marcador seleccionable amplificable la concentración de medicamento puede ser aumentada para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Los clones de las células modificadas estables son luego seleccionados para la expresión de la variante del polipéptido del Factor VII humano de interés.

La célula huésped en la que se introducen las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del Factor VII humano puede ser cualquier célula, que sea capaz de producir las variantes del polipéptido del Factor VII humano modificado postraducciona l e incluye levadura, hongos y células eucarióticas superiores.

Ejemplos de líneas celulares de mamífero para el uso en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), del riñón de cría de hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham *et Al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular de BHK preferida es la línea celular tk-ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982, incorporada aquí por referencia), de ahora en adelante denominadas células BHK 570. La línea celular BHK 570 ha sido depositada con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr.,

Rockville, Md. 20852, bajo el número de acceso de ATCC CRL 10314. Una línea celular tk⁻ ts13 BHK está también disponible por la ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Además, se pueden usar otras líneas celulares dentro de la presente invención, incluyendo Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77:4216-4220, 1980).

Ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos de los mismos están descritos, p. ej. en US 4.599.311, US 4.931.373, US 4.870.008, 5.037.743, y US 4.845.075, todos ellos incorporados en la presente por referencia. Las células transformadas están seleccionadas por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, de forma común resistencia a los medicamentos o por la capacidad para crecer en la ausencia de un nutriente particular, p. ej. la leucina. Un vector preferido para el uso en la levadura es el vector POT1 descrito en US 4.931.373. Las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del Factor VII humano pueden ser precedidas por una secuencia señal y opcionalmente una secuencia líder, p. ej. según el modo descrito anteriormente. Otros ejemplos de células de levadura adecuadas son cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *Hansenula*, p. ej. *H. polymorpha*, o *Pichia*, p. ej. *P. pastoris* (ver. Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132, 1986; págs. 3459-3465; US 4.882.279).

Ejemplos de otras células micóticas son células de hongos filamentosos, p. ej. *Aspergillus spp.*, *Neurospora spp.*, *Fusarium spp.* o *Trichoderma spp.*, en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. Niger*. El uso de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe p. ej., en EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438, la transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, efectuarse como se describe por Malardier *et al.*; 1989; Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma spp.* puede ser realizada por ejemplo como se describe en EP 244 234.

Cuando se usa un hongo filamentosos como la célula huésped, puede ser transformado con el constructo de ADN de la invención, convenientemente mediante la integración del constructo de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración está generalmente considerada como una ventaja ya que la secuencia de ADN es más probable que se mantenga estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, p. ej. por recombinación homóloga o heteróloga.

La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos heterólogos en las mismas puede ser realizada como se describe en US 4.745.051; US 4.879.236; US 5.155.037, 5.162.222; EP 397.485) todos incorporados aquí por referencia. La línea celular de insecto usada como huésped puede de manera adecuada ser una línea celular de *Leptidoptera*, tales como las células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia ni* (ver. US 5.077.214). Las condiciones de cultivo pueden de manera adecuada ser como se describe en, por ejemplo, WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas.

La célula huésped transformada o modificada anteriormente descrita es luego cultivada en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión de la variante del polipéptido del Factor VII humano tras lo cual todo o parte del péptido resultante puede ser recuperado del cultivo. El medio de cultivo usado para las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer las células huéspedes, tales como medios mínimos o complejos que contienen los suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales o pueden ser preparados conforme a recetas publicadas (p. ej. en los catálogos de la American Type Culture Collection). La variante del polipéptido del Factor VII humano producida por las células puede luego ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteináceos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

La tecnología de animales transgénicos puede ser empleada para producir las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención. Se prefiere producir las proteínas dentro de las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y la posterior secreción de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche es fácilmente recogida, está disponible en grandes cantidades, y bioquímicamente está bien caracterizada. Además, la mayoría de las proteínas de la leche están presentes en la leche en concentraciones altas (normalmente de aproximadamente de 1 a 15 g/l).

Desde un punto de vista comercial, es claramente preferible usar como huésped una especie que tenga un gran rendimiento en la leche. Aunque se pueden usar animales más pequeños tales como ratones y ratas (y son preferidos en la comprobación de la fase principal), se prefiere usar mamíferos de ganado incluyendo, pero no limitados a cerdos, cabras, ovejas y vacas. Las ovejas son particularmente preferidas debido a factores tales como la historia anterior sobre la transgénesis en estas especies, el rendimiento de la leche, el coste y la rápida disponibilidad de equipamiento para recolectar la leche de oveja (ver, por ejemplo, WO 88/00239 para una comparación de los factores que influyen en la elección de especies huéspedes). Es generalmente deseable seleccionar una raza de animal huésped que haya sido criada para el uso en la industria lechera, tal como la oveja East Friesland, o introducir ganado lechero mediante la cría de la línea transgénica en una fecha posterior. De cualquier manera, se deberían usar los animales con buen estado de salud conocido.

Para obtener la expresión en la glándula mamaria, se usa un promotor de la transcripción de un gen de proteínas de la leche. Los genes de proteínas de la leche incluyen aquellos genes que codifican caseínas (ver U.S. 5.304.489), beta-lactoglobulina, a-lactalbumina, y proteína ácida de lactosuero. Se prefiere el promotor de beta-lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de la beta-lactoglobulina ovina, una región proximal de al menos los 406 bp de la secuencia

5 flanqueadora 5' del gen será generalmente usada, aunque se prefieren partes mayores de la secuencia flanqueadora 5', hasta aproximadamente 5 kbp, tales como un segmento de ADN de -4,25 kbp que comprende la parte promotora flanqueadora 5' y no codificante del gen de la beta-lactoglobulina (ver Whitelaw *et al.*, Biochem. J. 286: 31-39 (1992)). Fragmentos similares del promotor de ADN de otras especies son también adecuados.

10 Otras regiones del gen de la beta-lactoglobulina pueden también ser incorporadas en los constructos, así como también las regiones genómicas del gen que debe ser expresado. Está generalmente aceptado en la técnica que los constructos carentes de intrones, por ejemplo, se expresan mal en comparación con aquellos que contienen secuencias de ADN de este tipo (Ver Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelaw *et al.*, Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; y WO 91/02318,

15 cada uno de ellos incorporado aquí por referencia). En este sentido, es generalmente preferido, cuando es posible, usar secuencias genómicas que contienen todos o algunos intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, por lo tanto se prefiere la inclusión adicional de al menos algunos intrones de, p. ej., el gen de la beta-lactoglobulina. Tal región es un segmento de ADN que proporciona la división de intrones y la poliadenilación del ARN de la región 3' no codificante del gen de la beta-lactoglobulina ovina. Cuando se sustituye por las secuencias no

20 codificantes 3' naturales de un gen, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede realzar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o del polipéptido de interés. Dentro de otras formas de realización, la región que rodea el ATG de iniciación de la secuencia de la variante del Factor VII es sustituida con secuencias correspondientes de un gen específico de la proteína de la leche. Tal sustitución proporciona un entorno de iniciación tejido-específico putativo para potenciar la expresión. Es conveniente reemplazar las secuencias enteras no codificantes prepro y 5' de la variante

25 del Factor VII con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque se pueden reemplazar regiones más pequeñas.

Para la expresión de variantes del polipéptido del Factor VII en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica la variante del Factor VII está operativamente enlazado a segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para producir unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado

30 arriba, al igual que las secuencias que proporcionan la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Las unidades de expresión adicionales incluyen un segmento de ADN que codifica una secuencia señal secretora operativamente enlazada al segmento que codifica el Factor VII modificado. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia señal secretora del Factor VII nativo o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de la leche (ver, por ejemplo, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); y Meade *et al.*, U.S. 4.873.316, que se

35 incorporan aquí por referencia).

La construcción de unidades de expresión para el uso en animales transgénicos es convenientemente realizada mediante la inserción de una secuencia de la variante del Factor VII en un plásmido o vector fágico conteniendo los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión puede ser construida esencialmente por cualquier secuencia de ligaciones. Es particularmente conveniente proporcionar un vector conteniendo un segmento de ADN que

40 codifica una proteína de la leche y reemplazar la secuencia de codificación en la proteína de la leche con la de una variante del Factor VII; de ese modo creando una fusión génica que incluye las secuencias de control de la expresión del gen de la proteína de la leche. De cualquier manera, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de la variante del Factor VII. La amplificación es convenientemente

45 realizada en células huéspedes bacterianas (p. ej. *E. coli*), así los vectores normalmente incluyen un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en las células huéspedes bacterianas. La unidad de expresión es luego introducida en ovarios fertilizados (incluyendo los embriones de la fase temprana) de las especies huéspedes elegidas. La introducción de ADN heterólogo puede ser realizada por una de varias vías, incluyendo la microinyección (p. ej. patente estadounidense n°. 4.873.191), infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) o la integración sitio dirigida usando las células de vástago embrionario (VE) (revisadas por Bradley *et al.*, Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Los ovarios son luego implantados en los oviductos o úteros de hembras pseudopreñadas y se dejan

50 evolucionar hasta el final. La descendencia que lleva el ADN introducido en su línea germinal puede pasar el ADN en su progenie en la forma mendeliana normal, permitiendo el desarrollo de greyes transgénicos. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall *et al.*, Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler *et al.*, Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert *et al.*, Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort *et al.*, Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall *et al.*, J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); U.S. 4.873.191; U.S. 4.873.316; WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; y GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de ADN externas en mamíferos y sus células germinales fueron

60 originalmente desarrolladas en ratones (ver, p. ej., Gordon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77: 7380-7384 (1980); Gordon y Ruddle, Science 214:1244-1246 (1981); Palmiter y Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985); y Hogan *et al.* (*ibid*)). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para el uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (ver, p. ej., WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988)). En resumen, en la vía más eficaz usada hasta el

65 momento en la generación de ratones o ganado transgénicos, varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés son inyectados en uno de los pronúcleos de un ovario fertilizado según las técnicas establecidas. También se puede emplear la inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto.

La producción en plantas transgénicas puede también ser empleada. La expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo (ver, Hiatt, *Nature* 344:469-479 (1990); Edelbaum *et al.*, *J. Interferon Res.* 12:449-453 (1992); Sijmons *et al.*, *Bio/Technology* 8:217-221 (1990); y EP 0 255 378).

Las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención son recuperadas del medio de cultivo celular o de la leche. Las variantes del polipéptido del Factor VII de la presente invención pueden ser purificadas por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitadas a, la cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (ver, p. ej., *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989). Preferiblemente, éstas pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-factor VII. El uso de anticuerpos calcio-dependientes monoclonales, como se describe por Wakabayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 11097-11108; (1986) y Thim *et al.*, *Biochemistry* 27: 7785-7793, (1988), es particularmente preferido. La purificación adicional puede ser conseguida por medios de purificación química convencionales, tales como la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo la precipitación de citrato de bario, son conocidos en la técnica, y pueden ser aplicados a la purificación de las nuevas variantes del polipéptido del Factor VII descritas aquí (ver, por ejemplo, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Para fines terapéuticos se prefiere que las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención sean substancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención se purifiquen hasta al menos aproximadamente un 90 a un 95% de homogeneidad, preferiblemente al menos aproximadamente hasta un 98% de homogeneidad. La pureza puede ser evaluada p. ej. por electroforesis en gel y por secuenciación del aminoácido aminoterminal.

La variante del Factor VII se secciona en su sitio de activación para convertirse en su forma bicatenaria. La activación puede ser realizada conforme a procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Osterud, *et al.*, *Biochemistry* 11:2853-2857 (1972); Thomas, Patente estadounidense No. 4.456,591; Hedner y Kisiel, *J. Clin. Invest.* 71:1836-1841 (1983); o Kisiel y Fujikawa, *Behring Inst. Mitt.* 73:29-42 (1983). De forma alternativa, como se describe por Bjoern *et al.* (Research Disclosure,; 269 Septiembre 1986; págs. 564-565), el Factor VII puede ser activado pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar. La variante resultante del Factor VII activado puede luego ser formulada y administrada como se describe abajo.

Ensayos

La invención también proporciona ensayos adecuados para seleccionar las variantes del Factor VIIa según la invención. Estos ensayos pueden ser realizados como una prueba simple preliminar *in vitro*.

Así, el Ejemplo 3 aquí expone una prueba simple (titulada "Ensayo de Hidrólisis *in Vitro*") para la actividad de las variantes del Factor VIIa de la invención. Basado en esto, las variantes del Factor VIIa que son de interés particular son las variantes en las que la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del factor VII nativo mostrada en la Fig. 1 es superior a 1,0, p. ej. al menos aproximadamente 1,25, preferiblemente al menos aproximadamente 2,0, tal como al menos aproximadamente 3,0 o, incluso más preferido, al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de hidrólisis *in vitro*".

La actividad de las variantes puede también ser medida usando un sustrato fisiológico tal como el Factor X ("Ensayo de proteólisis *in vitro*") (ver Ejemplo 4), de manera adecuada a una concentración de 100-1000 nM, donde el Factor Xa generado es medido después de la adición de un sustrato adecuado cromogénico (p. ej. S-2765). Además, el ensayo de actividad puede ser realizado a la temperatura fisiológica.

La capacidad de las variantes del factor VIIa para generar trombina puede también ser medida en un ensayo comprendiendo todos los factores e inhibidores de la coagulación pertinentes en concentraciones fisiológicas (menos el Factor VIII cuando imita las condiciones de la hemofilia A) y plaquetas activadas (como se describe en pág. 543 en Monroe *et al.* (1997) *Brit. J. Haematol.* 99, 542-547 que se incorpora en la presente como referencia).

Administración y composiciones farmacéuticas

Las variantes del polipéptido del Factor VII según la presente invención pueden ser usadas para controlar los trastornos hemorrágicos que tienen diferentes causas tales como deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de la coagulación) o inhibidores del factor de coagulación, o pueden ser usadas para controlar la hemorragia que ocurre en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea de funcionamiento normal (sin deficiencias del factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Las hemorragias pueden ser provocadas por una función defectuosa de las plaquetas, la trombocitopenia o la enfermedad de von Willebrand. Éstas pueden también observarse en sujetos en los que se ha inducido mediante varios estímulos una actividad fibrinolítica aumentada.

En sujetos que experimentan grandes daños tisulares asociados con la cirugía o un trauma grande, el mecanismo hemostático puede verse saturado por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar hemorragias a pesar

de un mecanismo hemostático normal. La consecución de una hemostasis satisfactoria es también un problema cuando las hemorragias ocurren en órganos tales como el cerebro, la región de la oreja interna y los ojos y puede también ser un problema en casos de hemorragias difusas (gastritis hemorrágica y hemorragia uterina profusa) cuando la fuente es difícil de identificar. El mismo problema puede surgir en el proceso de la toma de biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en cirugía laparoscópica. Estas situaciones comparten la dificultad de proporcionar hemostasis por técnicas quirúrgicas, (sutura, clips, etc.). Las hemorragias agudas y profusas pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante en los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Estos sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en el caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. Otra situación que puede causar problemas en el caso de una hemostasis insatisfactoria es cuando se da a sujetos con un mecanismo hemostático normal una terapia anticoagulante para evitar una enfermedad tromboembólica. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, Warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K al igual que la aspirina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria.

Una activación sistémica de la cascada de coagulación puede llevar a una coagulación intravascular diseminada (CID). No obstante, tales complicaciones no han sido vistas en sujetos tratados con dosis altas de Factor VIIa recombinante por un proceso hemostático localizado del tipo inducido por la formación compleja entre el Factor VIIa y el FT expuesto en el sitio de la lesión en la pared del vaso. Las variantes del polipéptido del Factor VII según la invención pueden ser usadas de esta manera también en su forma activada para controlar las hemorragias excesivas asociadas con un mecanismo hemostático normal.

Para el tratamiento relacionado con las intervenciones deliberadas, las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención normalmente serán administradas dentro del período de aproximadamente 24 horas antes de realizar la intervención, y durante 7 días o más. La administración como un coagulante puede hacerse por una variedad de vías como se describe en la presente.

La dosis de las variantes del polipéptido del Factor VII varía de aproximadamente 0,05 mg a 500 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un sujeto de 70 kg como dosis de carga y de mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y de la gravedad de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas están principalmente destinadas a la administración parenteral para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son administradas parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutáneamente, o intramuscularmente, o puede ser administrada por infusión continua o pulsátil. Las composiciones para la administración parenteral comprenden la variante del Factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelta en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Se puede usar una variedad de portadores acuosos, tales como agua, agua tamponado; solución salina (0,4%); glicina (0,3%) y similares. Las variantes del polipéptido del Factor VII de la invención pueden también ser formuladas en preparaciones de liposomas para la entrega o focalización de los sitios dañados. Las preparaciones de liposomas están generalmente descritas, p. ej., en U.S. 4.837.028, U.S. 4.501.728, y U.S. 4.975.282. Las composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para el uso o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril acuosa antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como los agentes reguladores del pH y los agentes tampón, los agentes reguladores de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

La concentración de variante del Factor VII en estas formulaciones puede variar mucho, es decir, de menos de aproximadamente el 0,5% en peso, normalmente a o al menos aproximadamente el 1% en peso hasta incluso el 15 o 20% en peso y será seleccionada principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., conforme al modo de administración seleccionado particular.

Así, una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa puede ser realizada para que contenga 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg de variante del Factor VII. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente son conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y están descritos con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

Las composiciones que contienen las variantes del polipéptido del Factor VII de la presente invención pueden ser administradas para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En usos terapéuticos, las composiciones son administradas a un sujeto que ya padece una enfermedad, según el modo descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizarlo está definida como "cantidad terapéuticamente efectiva". Como será entendido por un experto en la materia, las cantidades eficaces para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y estado general del sujeto. En general, no obstante, la cantidad eficaz variará de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 500 mg de variante del Factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosificaciones de aproximadamente 1,0 mg hasta aproximadamente 200 mg de variante del Factor VII por día siendo la forma de uso más común.

Los polipéptidos de FVIIa de la presente invención pueden generalmente ser empleados para una enfermedad seria o estados de lesión, es decir, situaciones que amenazan o amenazan potencialmente la vida. En estos casos, vista la minimización de sustancias extrañas y la carencia general de inmunogenicidad de las variantes del polipéptido del Factor VII humano en seres humanos, puede ser considerado deseable por el médico tratante el hecho de administrar un exceso sustancial de estas composiciones de la variante del Factor VII.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la variante del Factor VII de la invención son administradas a un sujeto susceptible de o por el contrario en riesgo de un estado de enfermedad o lesión para aumentar la propia capacidad coagulante del sujeto. Tal cantidad está definida como una “dosis profilácticamente efectiva”. En aplicaciones profilácticas, las cantidades precisas otra vez dependen del estado de salud y del peso del sujeto, pero la dosis generalmente varía de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 500 mg al día para un sujeto de 70-kilogramos, de forma más común de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg al día para un sujeto de 70-kilogramos.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones puede llevarse a cabo con los niveles de dosis y modelos seleccionados por el médico tratante. Para sujetos ambulatorios que requieren niveles de mantenimiento diarios, las variantes del polipéptido del Factor VII pueden ser administradas por infusión continua usando p. ej. un sistema de bombeo portátil.

La entrega local de la variante del Factor VII de la presente invención, como, por ejemplo, la aplicación tópica puede ser realizada, por ejemplo, mediante una pulverización, perfusión, catéteres de balón doble, stent, incorporada en injertos vasculares o stents, hidrogeles usados para revestir catéteres de balón, u otros métodos bien establecidos. De cualquier manera, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de variante del Factor VII suficiente para tratar eficazmente al sujeto.

La presente invención está ilustrada con mayor detalle por los ejemplos siguientes los cuales, no obstante, no deben ser interpretados como limitando el objetivo de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, ambos por separado y en cualquier combinación de los mismos, ser fundamentales para realizar la invención de diversas maneras de la misma.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa del Factor VII de coagulación humana nativo (tipo salvaje) (SEC ID NO:1).

Ejemplos

La terminología para las sustituciones de aminoácidos usada en los ejemplos siguientes es la siguiente. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de la SEC ID NO:1. El número siguiente representa la posición en la SEC ID NO:1. La segunda letra representa la sustitución del aminoácido diferente por el aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/F374Y-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID NO:1 es sustituida por una valina y la fenilalanina en la posición 374 de la SEC ID NO:1 es sustituida por una tirosina, ambas mutaciones en la misma variante del Factor VII.

Ejemplo 1

El ADN que codifica L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K:337A/F374Y-FVII, L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII, y V158D/E296V/M298Q/L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII.

Los constructos de ADN que codifican L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K337A/F374Y-FVII, L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII, y V158D/E296V/M298Q/L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII fueron preparados por mutagénesis sitio dirigida usando un vector de ADN bicatenario superenrollado con un injerto de interés y dos cebadores sintéticos que contenían la mutación deseada. Los cebadores siguientes fueron usados (en reacciones de PCR posteriores si fueran necesarias para obtener la variante de FVII deseada):

Para L305V-FVII:

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (SEC ID NO:2)

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (SEC ID NO:3)

ES 2 293 088 T3

Para K337A-FVII:

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEC ID NO:4)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEC ID NO:5)

Para V158D-FVII:

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:6)

5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:7)

Para E296V/M298Q-FVII:

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID NO:8)

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (SEC ID NO:9)

Para S314E-FVII:

5'-GCC TGC AGC AGG AAC GGA AGG TGG GAG ACT CC-3' (SEC ID NO:10)

GGA 5' GTC TCC CAC CTT CCG TTC CTG CTG CAG GC-3' (SEC ID NO:11)

Para F374Y-FVII:

5'-CGC AAC CGT GGG CCA CTA TGG GGT GTA CAC C-3' (SEC ID NO:12)

5'-GGT GTA CAC CCC ATA GTG GCC CAC GGT TGC G-3' (SEC ID NO:13)

Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas del vector, fueron extendidos durante la variación de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. Al incorporar los cebadores, se generó un plásmido mutado conteniendo cortes en bisel. Después de la variación de la temperatura, el producto fue tratado con DpnI que es específico para el ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado conteniendo la mutación.

Los procedimientos para preparar un constructo de ADN para todas las variantes del FVII según la presente invención usando la reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores específicos para conseguir la variante de FVII deseada son conocidos por los expertos en la técnica (ver. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

Ejemplo 2

Preparación de L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K337A/F374Y-FVII, y L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII

Las células BHK fueron modificadas esencialmente tal y como se ha descrito anteriormente (Thim *et al.* (1988) Biochemistry 27, 7785-7793; Persson y Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante del FVII específica. La variante del Factor VII fue purificada como sigue:

El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de Q-Sefarosa de flujo rápido de 25-ml (Pharmacia Biotech) después de la adición de 5 mM de EDTA; Triton X-100 (0,1%) y 10 mM de Tris, ajuste de pH a 8.0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua.

ES 2 293 088 T3

La elución de la proteína fue realizada avanzando desde 10 mM tris; 50 mM NaCl; Tritón X-100 (0,1%); pH 8.0 a 10 mM tris; 50 mM NaCl; 25 mM CaCl₂, Tritón X-100 (0,1%), pH 8.0. Las fracciones conteniendo la variante de FVII específica fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25-ml conteniendo el anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) acoplada a Sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech).

La columna fue equilibrada con 50 mM de HEPES, pH 7.5; conteniendo 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y Tritón X-100 (0,02%). Después del lavado con un tampón de equilibrado y un tampón de equilibrado conteniendo 2 M de NaCl, la materia unida fue eluida con un tampón de equilibrado conteniendo 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, se añadió un exceso de CaCl₂ sobre EDTA o la variante de FVII específica fue transferida a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada fase fue seguido por las mediciones de ELISA del Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE. Otras variantes de las variantes de FVII según el Ejemplo 1 y todas las demás variantes según la presente invención pueden ser preparadas por el mismo método.

Ejemplo 3

Ensayo de hidrólisis in vitro

Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y la variante del Factor VIIa (ambos de aquí en adelante denominados como "Factor VIIa") son evaluados en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288; Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, es añadido al factor VIIa (concentración final 100 nM) en 50 mM de HEPES pH 7.4; conteniendo 0,1 M de NaCl; 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbancia a 405 nm es medida continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene ninguna enzima, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades de la variante del Factor VIIa y el Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = (A_{405 \text{ nm}} \text{ variante del Factor VIIa}) / (A_{450 \text{ nm}} \text{ Factor VIIa tipo salvaje})$$

Ejemplo 4

Ensayo de proteólisis in vitro

Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y variante del factor VIIa (ambos de aquí en adelante denominados "Factor VIIa") son evaluados en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Factor VIIa (10 nM) y factor X (0,8 microM) en 100 microL de HEPES 50 mM, a pH 7.4; conteniendo 0,1 M de NaCl; 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, son incubados durante 15 min. El seccionamiento del Factor X es luego detenido por la adición de 50 microL de HEPES 50 mM, pH 7.4; conteniendo 0,1 M de NaCl; 20 mM de EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generada es medida por la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm es medida continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco sin FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de la variante del Factor VIIa y del Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = (A_{450 \text{ nm}} \text{ variante del Factor VIIa}) / (A_{450 \text{ nm}} \text{ Factor VIIa tipo salvaje})$$

Ejemplo 5

Actividades relativas de variantes de FVIIA medidas en los ensayos descritos en los ejemplos 3 y 4

Variante	Proporción en el ejemplo 3	Proporción en el ejemplo 4
L305V/S314E/F374Y-FVIIa	3	3
L305V/K337A/F374Y-FVIIa	12	8
L305V/S314E/K337A/F374Y-FVIIa	23	11
FVIIa		
wt-FVIIa	1,0	1,0

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante apunta sólo a la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido bastante cuidado al redactar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP renuncia a toda responsabilidad en este sentido.

Documentos citados en la descripción

- EP 200421 A [0006]
- WO 0183725 A [0009]
- WO 0222776 A [0009]
- US 4784950 A [0218]
- US 4683202 A [0221]
- US 5288629 A [0223]
- US 4745051 A [0228] [0247]
- EP 397485 A [0228] [0247]
- US 5155037 A [0228] [0228] [0247]
- US 5162222 A [0228] [0228] [0247]
- US 4599311 A [0229] [0244]
- EP 238023 A [0230] [0235] [0245]
- EP 383779 A [0230]
- US 4870008 A [0233] [0234] [0244]
- WO 8702670 A [0233]
- US 4546082 A [0234]
- EP 16201 A [0234]
- EP 123294 A [0234]
- EP 123544 A [0234]
- EP 163529 A [0234]
- WO 8902463 A [0234]
- WO 9211378 A [0234]
- EP 215594 A [0235]
- WO 9005783 A [0236]
- US 5023328 A [0236]
- US 4713339 A [0240]
- US 4931373 A [0244] [0244]
- US 5037743 A [0244]
- US 4845075 A [0244]
- US 4882279 A [0244]

ES 2 293 088 T3

- EP 272277 A [0245]
- EP 184438 A [0245]
- 5 • EP 244234 A [0245]
- US 4879236 A [0247]
- US 5077214 A [0247]
- 10 • WO 8901029 A [0247]
- WO 8901028 A [0247]
- 15 • WO 8800239 A [0250] [0254] [0254]
- US 5304489 A [0251]
- WO 8901343 A [0252]
- 20 • WO 9102318 A [0252]
- US 4873316 A, Meade [0253] [0254]
- 25 • US 4873191 A [0254] [0254]
- WO 9005188 A [0254] [0254]
- WO 9211757 A [0254] [0254]
- 30 • GB 8700458 A [0254]
- EP 0255378 A [0255]
- 35 • US 4456591 A [0258]
- US 4837028 A [0268]
- US 4501728 A [0268]
- 40 • US 4975282 A [0268]
- DK 0300625 W, 2003 [0290]

45 Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- DICKINSON *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 14379-14384 [0007]
- GRAHAM *et al.* *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59-72 [0047] [0243]
- 50 • WAECHTER; BASERGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 1106-1110 [0047]
- URLAUB; CHASIN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0047] [0243]
- 55 • TAKEYA *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 14868-14872 [0218]
- ZOLLER; SMITH. *DNA*, 1984, vol. 3, 479-488 [0219]
- *Gene*, 1989, vol. 77, 61-68 [0219]
- 60 • PCR Protocols Academic Press 1990. [0219] [0282]
- BEAUCAGE; CARUTHERS. *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0221]
- 65 • MATTHES *et al.* *EMBO Journal*, 1984, vol. 3, 801-805 [0221]
- SAIKI *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0221]

ES 2 293 088 T3

- **SUBRAMANI** *et al. Mol. Cell Biol.*, 1981, vol. 1, 854-864 [0227]
- **PALMITER** *et al. Science*, 1983, vol. 222, 809-814 [0227]
- 5 • **BOSHART** *et al. Cell*, 1985, vol. 41, 521-530 [0227]
- **KAUFMAN; SHARP.** *Mol. Cell. Biol.*, 1982, vol. 2, 1304-1319 [0227]
- **VASUVEDAN** *et al. FEBS Lett.*, 1992, vol. 311, 7-11 [0228]
- 10 • **J.M. VLAK** *et al. J. Gen. Virology*, 1988, vol. 69, 765-776 [0228]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 12073-12080 [0229]
- 15 • **ALBER; KAWASAKI.** *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0229]
- **RUSSELL** *et al. Nature*, 1983, vol. 304, 652-654 [0229]
- **MCKNIGHT** *et al. The EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2093-2099 [0230]
- 20 • **PALMITER** *et al. Science*, 1983, vol. 222, 809-814 [0231]
- **ALBER; KAWASAKI.** *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0231]
- 25 • **MCKNIGHT** *et al. The EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2093-2099 [0231]
- **DENOTO** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 3719-3730 [0231]
- **O. HAGENBUCHLE** *et al. Nature*, 1981, vol. 289, 643-646 [0233]
- 30 • **L.A. VALLS** *et al. Cell*, 1987, vol. 48, 887-897 [0233]
- **M. EGEL-MITANI** *et al. Yeast*, 1990, vol. 6, 127-137 [0233]
- 35 • **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor 1989. [0237]
- **KAUFMAN; SHARP.** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0238]
- **SOUTHERN; BERG.** *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327-341 [0238]
- 40 • **LOYTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 422-426 [0238]
- **WIGLER** *et al. Cell*, 1978, vol. 14, 725- [0238]
- 45 • **CORSARO; PEARSON.** *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603- [0238]
- **GRAHAM; VAN DER EB.** *Virology*, 1973, vol. 52, 456- [0238]
- **NEUMANN** *et al. EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0238]
- 50 • **WIGLER** *et al. Cell*, 1978, vol. 14, 725-732 [0239]
- **CORSARO; PEARSON.** *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603-616 [0239]
- 55 • **GRAHAM; VAN DER EB.** *Virology*, 1973, vol. 52d, 456-467 [0239]
- **NEUMANN** *et al. EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0239]
- **WAECHTER; BASERGA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 1106-1110 [0243]
- 60 • **GLEESON** *et al. J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459-3465 [0244]
- **MALARDIER** *et al. Gene*, 1989, vol. 78, 147-156 [0245]
- 65 • **WHITELAW** *et al. Biochem. J.*, 1992, vol. 286, 31-39 [0251]
- **BRINSTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 836-840 [0252]

ES 2 293 088 T3

- **PALMITER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 478-482 [0252]
- **WHITELAW** *et al. Transgenic Res.*, 1991, vol. 1, 3-13 [0252]
- 5 • **VON HEIJNE** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690 [0253]
- **JAENISCH**. *Science*, 1988, vol. 240, 1468-1474 [0254]
- **BRADLEY** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 534-539 [0254]
- 10 • **HOGAN** *et al. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory* 1986. [0254]
- **SIMONS** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 179-183 [0254] [0254]
- 15 • **WALL** *et al. Biol. Reprod.*, 1985, vol. 32, 645-651 [0254]
- **BUHLER** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 140-143 [0254]
- 20 • **EBERT** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 835-838 [0254]
- **KRIMPENFORT** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 844-847 [0254]
- **WALL** *et al. Cell. Biochem.*, 1992, vol. 49, 113-120 [0254]
- 25 • **GORDON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 7380-7384 [0254]
- **GORDON; RUDDLE**. *Science*, 1981, vol. 214, 1244-1246 [0254]
- 30 • **PALMITER; BRINSTER**. *Cell*, 1985, vol. 41, 343-345 [0254]
- **BRINSTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4438-4442 [0254]
- **HIATT**. *Nature*, 1990, vol. 344, 469-479 [0255]
- 35 • **EDELBAUM** *et al. J. Interferon Res.*, 1992, vol. 12, 449-453 [0255]
- **SIJMONS** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 217-221 [0255]
- 40 • **WAKABAYASHI** *et al. J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 11097-11108 [0256]
- **THIM** *et al. Biochemistry*, 1988, vol. 27, 7785-7793 [0256] [0283]
- **OSTERUD** *et al. Biochemistry*, 1972, vol. 11, 2853-2857 [0258]
- 45 • **HEDNER; KISIEL**. *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 71, 1836-1841 [0258]
- **KISIEL; FUJIKAWA**. *Behring Inst. Mitt.*, 1983, vol. 73, 29-42 [0258]
- 50 • **BJOERN** *et al. Research Disclosure*, 1986, vol. 269, 564-565 [0258]
- **MONROE** *et al. Brit. J. Haematol.*, 1997, vol. 99, 542-547 [0262]
- 55 • **PERSSON; NIELSEN**. *FEBS Lett.*, 1996, vol. 385, 241-243 [0283]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) donde K337 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
2. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 1, donde K157 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 10 3. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde D334 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
4. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde S336 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 15 5. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde V158 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 20 6. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde E296 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
7. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde M298 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 25 8. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde L305 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
9. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde S314 es sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 30 10. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de la proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 35 11. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 10, donde como mucho 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de la proteasa han sido sustituidos por cualquier otro aminoácido.
- 40 12. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde al menos un aminoácido correspondiendo a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 45 13. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde al menos un aminoácido correspondiendo a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
14. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 13, donde R304 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Phe, Leu, y Met.
- 50 15. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde al menos un aminoácido correspondiendo a un aminoácido a una posición seleccionada de 306-312 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
16. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 15, donde M306 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, y Asn.
- 55 17. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 15, donde D309 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, y Thr.
18. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-17, donde al menos un aminoácido correspondiendo a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de la SEC ID NO:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 60 19. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-18, donde A274 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 65 20. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 19, donde dicho A274 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Met Leu, Lys, y Arg.

ES 2 293 088 T3

21. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2; donde dicho K157 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

22. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 1, donde dicho K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

23. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3; donde dicho D334 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

24. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4; donde dicho S336 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

25. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 5; donde dicho V158 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

26. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 6; donde dicho E296 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Ile, Leu y Val.

27. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 7; donde dicho M298 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn.

28. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 8; donde dicho L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Tyr y Ile.

29. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1, 9; donde dicho S314 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Lys, Gln y Glu.

30. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho F374 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, y Tyr.

31. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 30, donde dicho F374 ha sido sustituido por Tyr.

32. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 15, 18-19; donde el aminoácido ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido que puede ser codificado por constructos de polinucleótido.

33. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde dicho polipéptido del Factor VII es el Factor VII humano.

34. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde dicho polipéptido del Factor VII es el Factor VII humano.

35. Polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-34, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del polipéptido del Factor VIIa nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25.

36. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 35, donde dicha proporción es al menos aproximadamente 2,0, preferiblemente al menos aproximadamente 4,0.

37. Polipéptido del Factor VII que es F374Y/L305V/S314E/K:337A-FVII.

38. Polipéptido del Factor VII que es F374Y/L305V/K337A-FVII.

39. Constructo de polinucleótido que codifica el polipéptido del Factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-38.

40. Constructo de polinucleótido según la reivindicación 39, que es un vector.

41. Célula huésped que comprende el constructo de polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 39-40.

42. Célula huésped según la reivindicación 41, que es una célula eucariótica.

43. Célula huésped según la reivindicación 42, que es de origen mamífero.

44. Célula huésped según la reivindicación 43, donde la célula está seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.

45. Animal transgénico no humano que contiene y expresa el constructo de polinucleótido tal y como se define en la reivindicación 39.

46. Planta transgénica que contiene y expresa el constructo de polinucleótido tal y como se define en la reivindicación 39.

5 47. Método para la producción del polipéptido del Factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38, el método comprendiendo el cultivo de una célula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 41-44 en un medio de crecimiento apropiado bajo las condiciones que permiten la expresión del constructo de polinucleótido y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

10 48. Método para la producción del polipéptido del Factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38, el método comprendiendo la recuperación del polipéptido del Factor VII de la leche producido por el animal transgénico definido en la reivindicación 45.

15 49. Método para la producción del polipéptido del Factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38, el método comprendiendo el cultivo de una célula de una planta transgénica tal y como se define en la reivindicación 46, y la recuperación del polipéptido del Factor VII de la planta.

20 50. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) donde K337 es sustituido por cualquier otro aminoácido; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

51. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-38, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

25 52. Uso de un polipéptido del Factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) sustitución de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) donde K337 es sustituido por cualquier otro aminoácido; para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hemorrágicos o episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

30 53. Uso de polipéptido del Factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-38 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hemorrágicos o episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1 - Secuencia de aminoácidos del Factor FVII de la coagulación humana nativo (SEC ID NO. 1)

```

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
      5              10              15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
    20              25              30              35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
    40              45              50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
    55              60              65              70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-
    75              80              85              90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
    95              100             105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
   110             115             120             125

Cys-Thr-Pro-Thr-Val-Glu-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Ile-Pro-Ile-Leu-Glu-Lys-Arg-
   130             135             140

Asn-Ala-Ser-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Lys-Val-Cys-Pro-Lys-Gly-
   145             150             155             160

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
   165             170             175             180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-
   185             190             195

```

His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
215
Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
230
Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
250
Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
265 270
Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-
285
Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-
305 306
Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
320
Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
340
Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-
355 360
His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
375
Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
395

Fig. 2

SEC ID NO:2 (cebador de ADN para la preparación de L305V-FVII):
 5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3';

SEC ID NO:3 (cebador de ADN para la preparación de L305V-FVII):
 5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3';

SEC ID NO:4 (cebador de ADN para la preparación de K337A-FVII):
 5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' ;

SEC ID NO:5 (cebador de ADN para la preparación de K337A-FVII):
 5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' ;

SEC ID NO:6 (cebador de ADN para la preparación de V158D-FVII):
 5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' ;

SEC ID NO:7 (cebador de ADN para la preparación de V158D-FVII):
 5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' ;

SEC ID NO:8 (cebador de ADN para la preparación de E296V/M:298Q-FVII)
 5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' ;

SEC ID NO:9 (cebador de ADN para la preparación de E296V/M:298Q-FVII):
 5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' ;

SEC ID NO:10 (cebador de ADN para la preparación de S314E-FVII):
 5'-GCC TGC AGC AGG AAC GGA AGG TGG GAG ACT CC-3' ;

SEC ID NO:11 (cebador de ADN para la preparación de S314E-FVII):
 5'-GGA GTC TCC CAC CTT CCG TTC CTG CTG CAG GC-3' ;

SEC ID NO:12 (cebador de ADN para la preparación de F374Y-FVII):
 5'-CGC AAC CGT GGG CCA CTA TGG GGT GTA CAC C-3' ;

SEC ID NO:13 (cebador de ADN para la preparación de F374Y-FVII):
 5'-GGT GTA CAC CCC ATA GTG GCC CAC GGT TGC G-3'.

ES 2 293 088 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NOVO NORDISK A/S

5 <120> POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII DE LA COAGULACIÓN HUMANA

<130> 6544-wo

10 <140> PCT/DKO3/00625

<141> 2003-09-24

15 <150> PA 2002 01423

<151> 2002-09-25

<160> 13

20 <170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 406

25 <212> PRT

<213> Factor VII de la coagulación humana

<220>

30 <223> xaa significa ácido 4-carboxiglutámico
(gamma-carboxiglutamato)

<400> 1

35 Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
20 25 30
40 Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
45 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
50 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
55 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
60 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
65 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg

ES 2 293 088 T3

	210	215	220
5	Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn 225 230 235 240		
	His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp 245 250 255		
10	His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr 260 265 270		
	Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu 275 280 285		
15	Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg 290 295 300		
	Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser 305 310 315 320		
20	Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser 325 330 335		
	Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr 340 345 350		
25	Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys 355 360 365		
	Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile 370 375 380		
30	Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu 385 390 395 400		
35	Leu Arg Ala Pro Phe Pro 405		

<210> 2

40 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:Secuencia artificial

<400> 2

50

cggtccccgg gtgatgaccc aggac

25

<210> 3

55 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial

<400> 3

65

gtcctggggtc atcacccggg gcacg

25

ES 2 293 088 T3

	<210> 4	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
10	<400> 4	
	cggatggcag cgcgactcc tgcaaggg	28
15	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
25	<400> 5	
	cccttgccagg agtccgcgt gccatccg	28
30	<210> 6	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
40	<400> 6	
	gtggggggca aggactgcc caaagggg	28
45	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
55	<400> 7	
	ccccttggg gcagtcctg ccccccac	28
60	<210> 8	
	<211> 36	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 293 088 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
5	<400> 8	
	gccacggccc tgggtctcca ggtcctcaac gtgccc	36
10	<210> 9	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
20	<400> 9	
	gggcacgttg aggacctgga gcaccagggc cgtggc	36
25	<210> 10	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
35	<400> 10	
	gcctgcagca ggaacggaag gtgggagact cc	32
40	<210> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
50	<400> 11	
	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial	
	<400> 12	
65	cgcaaccgtg ggccactatg ggggtgtacac c	31
	<210> 13	
	<211> 31	

ES 2 293 088 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:Secuencia artificial

<400> 13

10 ggtgtacacc ccatagtggc ccacggttgc g 31

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65